BRIEF REPORT

Investigating the Effect of Folinic Acid Toxicity on Oral Fibroblasts Cells

Tahereh Molania[1,2]
Parastoo Namdar[3,2]
Atieh Taheri[4]
Melika Mollaei[5]
Maedeh Salehi[1,2]
Rezvan Yazdian-Robati[6]

[1] Associate Professor, Department of Oral Medicine, Dental Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Faculty of Dentistry, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Orthodontics, Dental Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] Dentist, Sari, Iran
[5] Dentistry Student, Student Research Committee, Faculty of Dentistry, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[6] Assistant Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received November 14, 2023; Accepted April 4, 2024)

Abstract

Background and purpose: Due to the absence of a conclusive cure for a severely painful mouth ulcer, the creation of a medication to regulate this ailment is greatly advantageous. Folinic acid is a derivative of 5-formyl tetrahydrofolic acid. Unlike folic acid (the synthetic form of folate), folinic acid is a form of folate found naturally in foods. Folinic acid can be converted to other active forms of folate in the body and has the activity of the complete vitamin folic acid. Since folinic acid has wound-healing effects, it may play an important role in accelerating the healing of aphthous wounds. By determining the optimal dose, folinic acid can be suggested as a recommended treatment option for people with oral ulcers such as aphthous wounds. The purpose of this study is to investigate the effect of folinic acid on the growth of gingival fibroblast cells as a treatment for mouth ulcers.

Materials and methods: During this experimental study, human gingival fibroblast cell lines were cultured in sterile conditions in a DMEM culture medium of 10% bovine serum and 1% penicillin and tetracycline antibiotics at 37 degrees. These cells were exposed to different concentrations of folinic acid drug (5, 20, 25, 30, 40, 50, 80, 100 µM). The MTT method was used to evaluate cell viability and determine IC50 (inhibitory concentration). In this experiment, due to the uncertainty of its range of toxicity on cells, the relative toxicity was determined in a pilot phase and with few repetitions. Each concentration was repeated four times and incubated at different times (24, 48, and 72 hours). After the incubation time, the supernatant of each well was discarded and 100 µl of MTT solution was added to each well. After four hours of incubation, the supernatant was discarded and 100 µL of DMSO was added. Then, using an ELISA reader, the optical absorbance of each well was measured at a wavelength of 540-690 nm. Finally, IC50, which indicates the drug concentration necessary to inhibit 50% of cell growth, was calculated using the growth curve, and the results were analyzed using SPSS software version 19.

Results: In this study, the effect of folinic acid cytotoxicity on human gingival fibroblast cell line (HGF1) in a cell culture medium was investigated three times in different concentrations. The results showed that 70% of the cells were still alive in 24 hours up to a concentration of 100 µM, which can indicate the effective use of this drug for the treatment of pest damage. In 48 hours, IC50= 1.78 µM was obtained, which indicates that in studies with a time limit of 48 hours, up to a dose of 80 µM of folinic acid can be used to use the therapeutic effects of this drug. In 72 hours, IC50 was calculated as 66.7 µM.

Conclusion: These findings provide valuable information about the dose-response relationship and the impact of folic acid on HGF1 cells. It indicates that higher concentrations of folic acid are needed initially to achieve a significant reduction in cell growth, but with longer exposure, lower concentrations can be effective.

Keywords: folinic acid, cytotoxicity, human gingival fibroblast cells, oral aphthous, oral ulcer

J Mazandaran Univ Med Sci 2024; 34 (232): 213-217 (Persian).

Corresponding Author: Rezvan Yazdian-Robati - Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: yazdianr921@gmail.com)

گزارش کوتاه

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و چهارم شماره ۲۳۲ اردیبهشت سال ۱۴۰۳ (۲۱۷-۲۱۳)

بررسی اثر سمیت فولینیک اسید بر رده سلول‌های فیبروبلاست لثه انسانی

طاهره ملانیا[۱و۲]
پرستو نامدار[۳و۲]
عطیه طاهری[۴]
ملیکا ملایی[۵]
مائده صالحی[۱و۲]
رضوان یزدیان[۶]

چکیده

سابقه و هدف: از آن‌جایی‌که آفت دهانی بسیار دردناک است و درمان قطعی برای آن معرفی نشده است، تلاش در زمینه تهیه دارویی که این بیماری را کنترل نماید، بسیار مفید می‌باشد. اسید فولینیک مشتق ۵ فرمیل اسید تتراهیدروفولیک است. برخلاف اسید فولیک (شکل مصنوعی فولات)، اسید فولینیک یکی از اشکال فولات است که به‌طور طبیعی در غذاها یافت می‌شود. در بدن، اسید فولینیک می‌تواند به سایر اشکال فعال فولات تبدیل شود و فعالیت ویتامین کامل اسید فولیک را دارد. از آن‌جایی‌که اسید فولینیک، دارای اثرات ترمیم زخم است، ممکن است نقش مهمی در تسریع بهبود زخم‌های آفتی داشته باشد. این مطالعه با هدف بررسی تأثیر اسید فولینیک بر رشد سلول‌های فیبروبلاست لثه به‌عنوان یک درمان بالقوه برای زخم‌های دهان، انجام پذیرفت. با تعیین دوز بهینه، اسید فولینیک می‌تواند به‌عنوان یک گزینه درمانی توصیه شده برای افراد مبتلا به زخم دهان مانند افت پیشنهاد شود.

مواد و روش‌ها: طی این مطالعه تجربی، رده‌های سلولی فیبروبلاست لثه انسانی در شرایط استریل در محیط کشت DMEM و سرم گاوی ۱۰ درصد و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و تتراسیکلین ۱ درصد در دمای ۳۷ درجه کشت داده شدند. این سلول‌ها در معرض غلظت‌های مختلف از داروی فولینیک اسید (۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرومولار) قرار گرفتند. روش MTT برای ارزیابی زنده مانی سلول‌ها و تعیین IC50 (غلظت مهاری) استفاده شد. در این آزمایش به‌دلیل مشخص نبودن دامنه سمیت آن بر روی سلول‌ها در یک مرحله به‌صورت پایلوت و تکرارهای کم، سمیت نسبی تعیین شد. هر غلظت چهار بار تکرار شد و در زمان‌های مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) انکوبه شد. پس از زمان انکوباسیون، محیط رویی هر چاهک دور ریخته و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول MTT اضافه شد. پس از چهار ساعت انکوباسیون، محلول رویی دور ریخته و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد. سپس با استفاده از دستگاه الیزا ریدر، جذب نوری هر چاهک در طول موج ۵۴۰–۶۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در نهایت IC50 که نشان‌دهنده غلظت داروی لازم برای مهار ۵۰ درصد رشد سلول است با استفاده از منحنی رشد محاسبه شد و نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۹) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: در این مطالعه اثر سمیت سلولی فولینیک اسید بر رده سلولی فیبروبلاست لثه انسانی (HGF1) در محیط کشت سلولی در سه زمان در غلظت‌های مختلف بررسی شد. نتایج نشان داد در ۲۴ ساعت تا غلظت ۱۰۰ میکرومولار هنوز ۷۰ درصد از سلول‌ها زنده ماندند که این مورد می‌تواند نشانگر استفاده موثر از این دارو برای درمان آسیب‌های ضایعات آفتی باشد. در ۴۸ ساعت IC50= ۷۸/۱ میکرومولار به‌دست آمدکه این نشانگر این است که در مطالعاتی با محدوده زمانی ۴۸ ساعت می‌توان تا دوز نزدیک ۸۰ میکرومولار از فولینیک اسید جهت استفاده از تاثیرات درمانی این دارو استفاده کرد. در ۷۲ ساعت IC50 برابر با ۶۶/۷ میکرومولار محاسبه گردید.

استنتاج: یافته‌های این مطالعه نشان داد که غلظت‌های بالاتر اسید فولیک در ابتدا برای دستیابی به کاهش قابل توجهی در رشد سلولی مورد نیاز است، اما با قرار گرفتن در معرض طولانی‌تر، غلظت‌های پایین‌تر می‌تواند موثر باشد.

واژه های کلیدی: فولینیک اسید، سمیت سلولی، فیبروبلاست لثه انسانی، آفت دهانی، زخم دهان

مولف مسئول: رضوان یزدیان–ساری: کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، مرکز تحقیقات علوم دارویی E-mail: yazdianr921@gmail.com
۱. دانشیار، گروه بیماری های دهان، مرکز تحقیقات دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. استادیار، گروه ارتودنتیکس، مرکز تحقیقات دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. دندانپزشک، ساری، ایران
۵. دانشجوی دندانپزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۶. استادیار، مرکز تحقیقات علوم دارویی، پژوهشکده هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : ۱۴۰۲/۸/۲۳ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۴۰۲/۹/۲۹ تاریخ تصویب : ۱۴۰۳/۱/۱۸

مقدمه

استوماتیت آفتی نوعی زخم دردناک در دهان است که معمولاً در لب، گونه، زبان یا کف دهان ایجاد می‌شود. علت دقیق آن هنوز مشخص نیست، اما عواملی مانند ژنتیک، سیستم ایمنی ضعیف، کمبود ویتامین‌ها، استرس و تحریک‌های دهانی ممکن است نقش داشته باشند(۲،۱). روش‌های درمانی شیمیایی و گیاهی پیشنهاد شده که می‌تواند در تسکین درد و سوزش، کاهش دوره التیام و به تأخیر انداختن عود زخم‌ها موثر باشد. برانگیخته شدن سیستم ایمنی و واکنش‌های التهابی حاد باعث فراخوانی سلول‌های التهابی به بافت می‌شود(۳). اسید فولینیک مشتق ۵ فرمیل اسید تتراهیدروفولیک است. برخلاف اسید فولیک (شکل مصنوعی فولات)، اسید فولینیک یکی از اشکال فولات است که به‌طور طبیعی در غذاها یافت می‌شود. در بدن، اسید فولینیک می‌تواند به سایر اشکال فعال فولات تبدیل شود و فعالیت ویتامین کامل اسید فولیک را دارد. و برخلاف اسیدفولیک، عملکرد آن تحت تأثیر مهار دی‌هیدروفولات ردوکتاز قرار نمی‌گیرد(۴). از آن‌جایی‌که اسید فولینیک، دارای اثرات ترمیم زخم است، ممکن است نقش مهمی در تسریع بهبود زخم‌های آفتی داشته باشد(۵). از آن‌جاکه تأخیر در بهبود زخم‌های آفتی به ارتشاح بارز سلول‌های لنفوسیتی برمی‌گردد، درمان‌های کمکی که به کاهش التهاب کمک می‌کنند، می‌توانند موثر باشند(۶). هدف این مقاله بررسی تأثیر اسید فولینیک بر رشد سلول‌های فیبروبلاست لثه به‌عنوان یک درمان بالقوه برای زخم‌های دهان است. با تعیین دوز بهینه، اسید فولینیک می‌تواند به عنوان یک گزینه درمانی توصیه شده برای افراد مبتلا به زخم دهان مانند افت پیشنهاد شود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، به منظور انجام این پژوهش، سلول‌های فیبروبلاست لثه انسانی (HGF-1) از بانک سلولی دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد. سلول‌ها در شرایط استریل در محیط کشت DMEM و سرم گاوی ۱۰ درصد (Gibco, Korea) و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و تتراسیکلین ۱ درصد (Merck,Germany) در دمای ۳۷ درجه کشت داده شدند.

بررسی زنده ماندن سلول ها

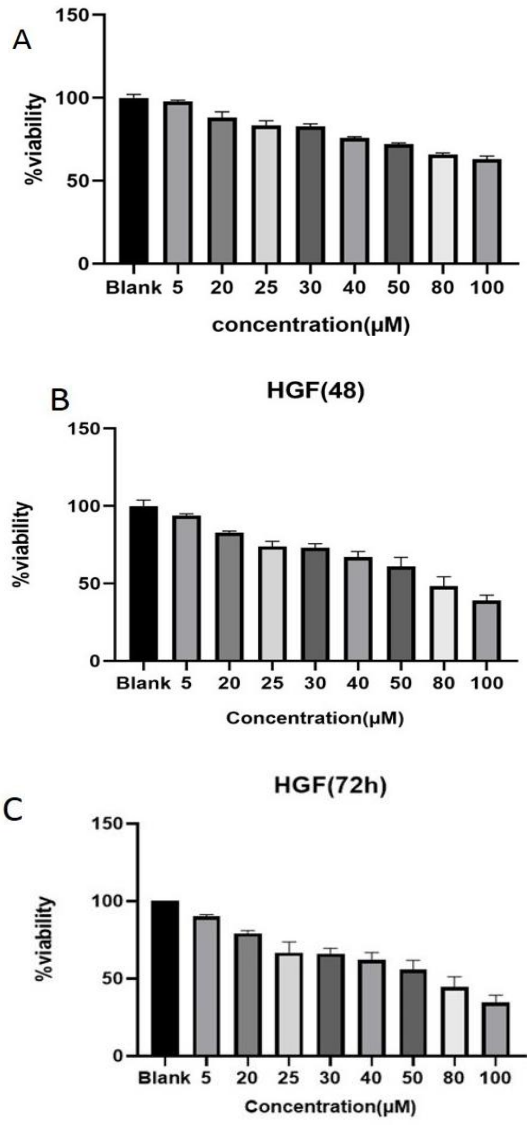
در این تحقیق برای بررسی اثر سمیت سلولی فولینیک اسید بر رده سلولی فیبروبلاست لثه انسانی، از آزمون MTT استفاده شد. برای انجام آزمایش، در هر چاهک میکروپلیت ۹۶ خانه، سوسپانسیون سلولی حاوی 10^4 سلول HGF افزوده شد. سپس داروی فولینیک اسید با غلظت‌های مختلف (۱۰۰-۵ میکرومولار) به هر چاهک اضافه شد و یک چاهک به عنوان کنترل تعیین شد که فقط حاوی سلول بود. در این آزمایش به‌دلیل مشخص نبودن دامنه سمیت آن بر روی سلول‌ها در یک مرحله به صورت پایلوت و تکرارهای کم، سمیت نسبی تعیین شد. هر غلظت چهار بار تکرار شد و در زمان‌های مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) انکوبه شد. پودر MTT به صورت ۵ میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر بافر فسفات حل شد و از فیلتر سرسرنگی عبور داده شد.

پس از زمان انکوباسیون، محیط رویی هر چاهک دور ریخته و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول MTT اضافه شد. پس از چهار ساعت انکوباسیون، محلول رویی دور ریخته و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد. سپس با استفاده از دستگاه الیزا ریدر، جذب نوری هر چاهک در طول موج ۵۴۰-۶۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. IC50 که نشان‌دهنده غلظت داروی لازم برای مهار ۵۰ درصد رشد سلول است با استفاده از منحنی رشد محاسبه شد و نتایج با استفاده از SPSS تجزیه و تحلیل شدند(۷).

یافته‌ها و بحث

براساس نتایج به‌دست آمده از تست سمیت سلولی، میزان زنده مانی سلول‌ها در نمودارهای ستونی رسم شد. در این مطالعه اثر سمیت سلولی فولینیک اسید بر رده سلولی فیبروبلاست لثه انسانی (HGF1) در محیط

کشت سلولی در سه زمان در غلظت‌های مختلف بررسی شد. میزان زنده مانی سلول‌ها پس از آماده کردن غلظت مورد نیاز از فولینیک اسید (۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرومولار) در زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ توسط روش MTT assay ارزیابی شد (نمودار شماره ۱).



نمودار شماره ۱: تعیین IC50 در سلول های فیبروبلاست پس از زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

همان طور که در نمودار شماره ۱ مشخص است در ۲۴ ساعت تا غلظت ۱۰۰ میکرومولار هنوز ۷۰ درصد از سلول‌ها زنده ماندندکه این مورد می‌تواند نشانگر استفاده موثر از این دارو برای درمان آسیب‌های ضایعات آفتی باشد. در ۴۸ ساعت IC50= ۷۸/۱ میکرومولار به‌دست آمدکه این نشانگر این است که در مطالعاتی با محدوده زمانی ۴۸ ساعت می‌توان تا دوز نزدیک ۸۰ میکرومولار از فولینیک اسید جهت استفاده از تاثیرات درمانی این دارو استفاده کرد. در ۷۲ ساعت IC50 برابر با ۶۶/۷ میکرومولار محاسبه گردید. کشت سلولی یکی از روش‌های بررسی سریع تأثیر داروهای مختلف بر روی رده‌های سلولی می‌باشد(۸). در این مطالعه تاثیر داروی اسید فولینیک بر مهار رشد سلول‌های HGF بررسی شد. در حال حاضر توافقی در مورد یک درمان موثر برای آفت که بتواند به‌طور کارآمد نشانه‌ها و علائم بیماری را با یک دوز روزانه کم و با اثرات حداقل کاهش دهد، وجود ندارد(۹). درمان افت علامتی است و شامل کاهش درد، زمان بهبودی، تعداد و اندازه زخم، و افزایش دوره‌های بدون بیماری است. گزینه‌های درمانی فعلی شامل عوامل موضعی، سیستمیک و موضعی مانند استروئیدها، کورتیکواستروئیدها، کوتریزاسیون، آنتی‌بیوتیک‌ها، دهان‌شویه‌های حاوی فعال آنزیم‌ها، درمان با لیزر و درمان ترکیبی است(۱۰). در یک تحقیق جدید، تأثیر فولینیک اسید و بوتولینوم توکسین A بر ترمیم زخم جراحی شکاف کام و لب در رت‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که استفاده از فولینیک اسید، با افزایش تکثیر فیبروبلاست و رسوب کلاژن، فرآیند بهبود زخم را تسریع می‌دهد. از طرف دیگر، استفاده از فولینیک اسید به‌طور موضعی، بهبود ترمیم زخم را تسریع داد و اثرات مثبتی بر فرآیند ترمیم نشان داد(۱۱). تا آن‌جایی‌که نویسندگان می‌دانند تاکنون مطالعه‌ای درباره اثر سمیت داروی اسید فولینیک بر روی رده سلولی HGF گزارش نشده است.

در این مطالعه دوز مناسب فولینیک اسید جهت درمان زخم‌های دهانی تعیین شد. با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت با افزایش زمان مجاورت سلول‌ها با اسید فولینیک، درجات پایینی از سمیت سلولی، ایجاد می‌شود.

سپاسگزاری

مقاله حاضر مستخرج از پایان نامه دکتری خانم عطیه طاهری با شماره طرح ۹۲۵۲ و با کد اخلاق IR.MAZUMS.REC.1401.14083 در دانشگاه علوم پزشکی مازندران می باشد. از همکاری معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران در حمایت از این طرح تشکر می گردد.

References

1. Namdar P, Yazdian-Robati R, Mozafari P, Hashemi M, Shiva A. Current Mucoadhesive Drug Delivery System for Recurrent Aphthous Stomatitis. Asian Journal of Dental Sciences 2022;5(4):1-17.
2. Hali H, Salehi Sarookollaei M, Molania T, Gohardehi S, Moosazadeh M, Mollaei M. Prevalence of recurrent aphthous stomatitis among children studying at public elementary schools in Sari County in 2019. Tabari Biomed Stu Res J 2023; 5(1): 11-16.
3. Edgar NR, Saleh D, Miller RA. Recurrent aphthous stomatitis: a review. J Clin Aesthetic Dermatol 2017; 10(3): 26-36.
4. Shea B, Swinden MV, Ghogomu ET, Ortiz Z, Katchamart W, Rader T, et al. Folic acid and folinic acid for reducing side effects in patients receiving methotrexate for rheumatoid arthritis. Cochrane Database Syst Rev 2013(5): CD000951.
5. Duman N, Duman R, Tosun M, Akıcı M, Göksel E, Gökçe B, et al. Topical folinic acid enhances wound healing in rat model. Adv Med Sci 2018; 63(2): 347-352.
6. Veysel G, Erdem S, Haliloglu Y, Bisgin A, Belkaya S, Başaran KE, et al. Immunodeficiency associated with A Novel Functionally defective Variant of SLC19A1 Benefited from Folinic Acid Treatment. Genes Immun 2023; 24(1): 12-20.
7. Hashemitabar S, Yazdian-Robati R, Hashemi M, Ramezani M, Abnous K, Kalalinia F. ABCG2 aptamer selectively delivers doxorubicin to drug-resistant breast cancer cells. J Biosc 2019; 44(2): 39.
8. Mohammadi H, Akhtari J, Assadpour S, Kamali M, Ebrahimnejad P. Synthesis and Characterization of Deferasirox PLGA Nanoparticles and Investigation of Toxicity in Cell Model. J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 32(214): 65-76 (Persian).
9. Kia SJ, Mansourian A, Basirat M, Akhavan M, Mohtasham-Amiri Z, Moosavi M-S. New concentration of curcumin orabase in recurrent aphthous stomatitis: A randomized, controlled clinical trial. Journal of Herbal Medicine 2020; 22(2): 100336.
10. Del Mazo RC, Forcén LG, Aguilar MEN. Recurrent aphthous stomatitis. Med Clin 2023; 161(6): 251-259.
11. Namdar P, Moaddabi A, Yazdian R, Saeedi M, Ahmadian F, Shiva A, et al. Histologic Evaluation of the Effects of Folinic Acid Chitosan Hydrogel and Botulinum Toxin A on Wound Repair of Cleft Lip Surgery in Rats. J Funct Biomater 2022; 13(3): 142.